*Cryptogamie, Mycol. 1993, 14 (2): 117-125

RESPUESTAS DE CRECIMIENTO DEL ALBARDIN (*LYGEUM SPARTUM* L.) A LA INOCULACION CON HONGOS MICORRICICOS Y A LA FERTILIZACION FOSFORADA

Gisela DIAZ y Mario HONRUBIA

Depto Biología Vegetal (Botánica). Facultad de Biología. Universidad de Murcia. 30071 Murcia. España.

RESUMEN - Se ha estudiado la respuesta de *Lygeum spartum* L. a la inoculación con hongos. A y ■ la fertilización fosforada. En uno de los experimentos, la micorrización con *Glomus fasciculatum* a distintas dosis de fertilización (0, 30, 60 y 90 mg P/kg suelo) produjo incrementos significativos de biomasa, especialmente con bajos niveles de fertilidad, obteniendose la máxima cosecha en plantas micorrizadas a la dosis de 60 mg/kg de adición de P.

En el otro experimento, se estudió el efecto de diferentes endófitos en dos suelos. No se observaron diferencias importantes entre los hongos, sino más bien según el suelo utilizado: Todos los hongos ensayados produjeron incrementos en la asimilacion de P en los dos suelos, pero solo dieron lugar a incrementos de crecimiento en uno de los suelos.

ABSTRACT - The growth response of *Lygeum spartum* L. to inoculation with mycorrhizal fungi and P-fertilization was studied. In one of the two experiments, the inoculation with *Glomus fasciculatum* at several fertilization rates (0, 30, 60, 90mg P/kg soil) produced a significant growth improvement, especially at low fertility levels. The maximum yield was obtained in mycorrhizal plants growing in soil with 60 mg/kg of added P.

In the other experiment, the effect of several mycorrhizal fungi was studied in two different soils. No differences were observed between fungi. All the fungi tested were effective in P uptake in both soils, but resulting to an increase of plant growth in only one of the soils tested.

INTRODUCCION

Extensas áreas de la Península Ibérica se encuentran sometidas a procesos de erosión y desertificación, con la consecuente pérdida de suelo. En estas zonas, se hace necesario en acciones de revegetación, la utilización de especies vegetales que por sus característísticas contribuyan a la recuperación de los suelos degradados.

Las gramíneas, debido al gran desarrollo de su sistema radical, influyen de modo decisivo en la establización del suelo pues ayudan ■ mantener una mayor y más prolongada infiltración, reduciendo por tanto, la erosión (FAO, 1978). *Lygeum spartum* L. es una gramínea de amplia distribución en áreas mediterráneas, capaz de tolerar condiciones extremas en cuanto a aridez, elevadas temperaturas, déficit de nutrientes en el suelo y salinidad.

Las micorrizas arbusculares (MA), presentes en una gran mayoría de las especies vegetales (Harley & Harley, 1987) son decisivas para el establecimiento de las plantas en suelos degradados (Barea et al., 1990). En suelos deficitarios, el principal

efecto de las MA sobre la fisiología de la planta huésped es el incremento en la asimilación de nutrientes, fundamentalmente P, que revierte en una estimulación del crecimiento (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988; Gianinazzi-Pearson & Azcon-Aguilar, 1991). La selección de hongos eficientes es especialmente útil en suelos alterados, con escasa o inadecuada población de hongos A autóctonos.

Hasta ahora, no existen datos previos de la micorrización de *L. spartum*. Los objetivos de este trabajo son, por un lado, evaluar el beneficio que obtiene la planta de la micorrización, es decir, la necesidad que tiene de las micorrizas para conseguir un crecimiento óptimo a un nivel dado de fertilidad del suelo (Gerdemann, 1975). Por otro lado, estudiar la susceptibilidad de la planta a la colonización radical con distintas especies de hongos A, y la efectividad de éstos en la estimulación de crecimiento y asimilación de nutrientes.

MATERIAL Y METODOS

Los suelos utilizados en los experimentos proceden de la provincia de Murcia (España): La Unión (suelo 1) y Portman (suelo 2). Ambos se encuentran afectados por procesos de erosión y degradación química a consecuencia de actuaciones mineras. Las características físico-químicas de los mismos se muestran en la Tabla 1. El suelo se pasó a través de un tamiz de 4 mm de luz de malla y se mezcló con arena de cuarzo en la proporcion 1/1 (v/v) con el fin de mejorar se textura. Esta mezcla se esterilizó por tindalización a vapor fluente durante 1 hora en 3 días consecutivos, con el fin de eliminar los propágulos de los endófitos A nativos. El sustrato estéril se dispuso en macetas de 600cm^3. Para reintegrar los componentes de la microbiota nativa se adicionó un filtrado del mismo suelo que se obtuvo agitando una mezcla de suelo y agua, dejándola sedimentar durante 3 o 4 horas y pasando el sobrenadante por cadena de filtros que permite el paso de bacterias y hongos de pequeño tamaño pero no los propágulos de hongos micorrícicos.

Las semillas de *L. spartum* se recolectaron en los alrededores del Campus Universitario de Espinardo (Murcia). Antes de su uso se limpiaron y esterilizaron en superficie, sumergiéndolas en H_2O_2 durante 30 minutos, tras lo cual se sometieron a sucesivos lavados con agua, manteniéndose finalmente en imbibición durante 12 horas para favorecer su germinación. La semillas se sembraron directamente en la maceta y se clarearon a 2 por maceta después de la germinación.

Los hongos utilizados como inóculo micorrícico fueron: *Glomus fasciculatum* (Thaxter ss. Gerd.) Gerd. y Trappe. y *G. mosseae* (Nicol y Gerd.) Gerd. y Trappe, procedentes de la coleccion de inóculos de la Estación Experimental de Zaidín, Granada; *G. etunicatum* Becker y Gerd., *Glomus sp.* GPR31, aislados de rizosfera de *Medicago sativa* y *G. mosseae* GPR30 aislado de rizosfera de *Dittrichia viscosa*, que crecían en la Bahía de Portman, Murcia. Estos hongos se multiplicaron en maceta con *Medicago sativa* como planta huésped, durante al menos 12 meses de crecimiento en invernadero con ciclo natural de luz y temperatura. 10g de inóculo micorrícico (consistente en suelo con fragmentos de raíces micorrizadas, esporas y micelio) se añadió a cada maceta a unos 3cm por debajo de la superficie del suelo, mezclándose cuidadosamente con éste.

	Suelo 1 La Unión, Murcia UTM XG 8763	Suelo 2 Portman, Murcia UTM XG 9062
pH	7,28	7,79
C.E. (dS/M)	4,56	6,54
M.O. (%)	1,31	0,53
N total (mg/100g)	74,00	47,00
P asim. (mg/kg)	1,86	2,09
K asim. (mg/100g)	30,11	23,85
Zn (mg/kg)	8,80	236,70
Pb (mg/kg)	31,00	368,00

Tabla 1: Características físico-químicas de los suelos.

Table 1: Physical and chemical characteristics of the soils.

Diseño experimental:

Experimento 1: Se estudió la respuesta de las plantas a la micorrización en relación con el nivel de fertilidad del suelo. Se utilizó suelo procedente de La Union (suelo 1). Se obtuvieron 4 niveles de fertilidad por la adición al suelo de 0, 30, 60 y 90 mg P/kg suelo, aplicado como H_2KPO_4 en disolución y dejando estabilizar el suelo durante 15 dias. Para cada tratamiento de adicion de P se prepararon dos series, una de las cuales se inoculo con *G. fasciculatum* mientras que la otra se mantuvo como control sin micorrizar.

Experimento 2: Se determinó la capacidad de asociación con diferentes hongos endomicorrícicos de *L. spartum*, y la efectividad de la simbiosis establecida. En el suelo 1 se ensayaron *G. fasciculatum*, *G. mosseae* y *Glomus sp.* GPR31 y en el suelo 2 se utilizaron ademas *G. mosseae* GPR30 y *G. etunicatum*.

Se establecieron cinco réplicas de cada tratamiento. Las plantas se mantuvieron en invernadero con ciclo natural de luz y temperatura y cada 15 días se adicionó solución nutritiva (Hewitt, 1952) carente de fósforo.

El periodo de crecimiento fue de 16 semanas, trás lo cual se determinó altura, peso fresco y seco (16h, 80°C) de la parte aerea y radical. El porcentaje de colonización micorrícica se determinó segun el método de Giovannetti y Mosse (1980) en porciones teñidas del sistema radical (Philips & Hayman, 1970). Tras la digestión de las muestras con ácido nítrico-perclórico 5:3 se determinó la concentración de P por colorimetría con verde de malaquita (Fernandez et al., 1985), midiéndo la absorbancia a 660 nm.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) comparándose las medias mediante el test de Duncan (Duncan, 1955).

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de la micorrización y la fertilización fosforada

Para los niveles 0, 30 y 60 de aplicación de P, las plantas micorrizadas superaron significativamente a las no micorrizadas en cuanto ■ los parámetros de pesos frescos y seco de la parte aeréa, y algo menos en cuanto a altura. Al nivel más alto de adición de P (90 mg/kg) el aumento de biomasa de las plantas micorrizadas no fue significativo (Tabla 2). El incremento del crecimiento inducido por la inoculación decreció al aumentar la dosis de adición de P al suelo, lo que confirma el hecho de que la simbiosis micorrícica es más eficaz en suelos deficientes en P o de fertilidad moderada (Hayman, 1983; Smith & Gianinazzi- Pearson, 1988; Barea, 1990.

El abonado fosforado dió lugar también a un aumento de la producción de biomasa, tanto en las plantas micorrizadas como en los controles no micorrizados. La cosecha máxima se obtuvo con la conjunción de inoculación y fertilización; esto es, en el tratamiento de plantas micorrizadas y con adición de 60 mg/kg de P.

Los porcentajes de micorrización fueron bajos en general, no superándose el 40%. Algunos autores han puesto de manifiesto un efecto inhibitorio del P a grandes concentraciones sobre la colonización micorrícica (Waterer & Coltman, 1988; Hetrick et al., 1990), que no se ha observado en este estudio. Puede hablarse mas bien de una tendencia al aumento en el porcentaje de infección con una adición de P de 60 mg/kg, coincidente con la máxima producción de biomasa, para volver a disminuir con dosis mayores. Incrementos de la colonozación radical con pequeñas adiciones de P, en sue-

	Adición de P (mg/kg)	Altura (cm)	Peso fresco (mg/planta)		Peso seco (mg/planta)		Micorrización (%)
			Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	
Control	0	14 a	215 a	350 a	61 a	73 a	0
	30	21 b	347 ab	663 b	105 bc	150 b	0
	60	23 b	356 ab	568 b	107 bc	119 b	0
	90	31 c	465 bcd	597 b	145 bcd	139 b	0
Micorrizado	0	27 bc	413 bc	681 b	120 bc	128 b	27
	30	29 bc	582 cd	758 b	157 cd	157 b	25
	60	28 bc	622 d	698 b	180 d	131 b	39
	90	28 bc	550 cd	751 b	155 cd	152 b	26

Tabla 2: Efecto de la inoculación y la fertilización fosforada sobre el crecimiento y la micorrización de plantas de *L. spartum*. Valores medios de cinco repeticiones. Los datos dentro de una misma columna con una letra en común no difieren significativamente (P <0.05) según el test de Duncan.

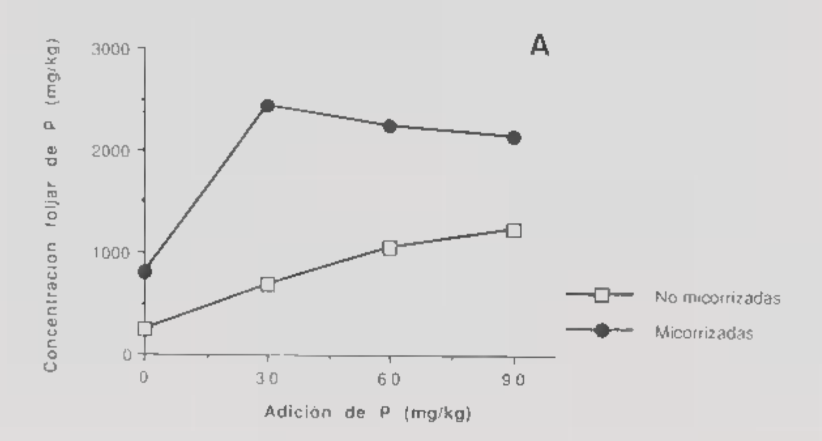
Tabla 2: Effect of inoculation and P-fertilization on growth and mycorrhizal colonization of *L. spartum*. Values are mean of five replicates. Data in a column followed by the same letter are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's test.

los muy deficientes en este nutriente han sido observados con anterioridad (Medina et al., 1988, 1990).

En la figura 1 se representan los valores relativos a la asimilación de P por la planta: En las plantas no micorrizadas, la concentración de P aumentó con la del suelo, mientras que en las micorrizadas se produjo un fuerte aumento con la primera dosis de adición, manteniéndose los niveles sin cambios importantes a dosis superiores (Figura 1 A). Los valores de P total asimilado indican asimismo una acumulación mayor de este elemento en las plantas micorrizadas (Figura 1 B).

Efecto de la inoculacion con diferentes hongos A

En el suelo 1 todos los hongos ensayados produjeron un incremento significativo en la altura y pesos fresco y seco de la parte aérea y radical, siendo los tres hongos igualmente efectivos (Tabla 3). En cambio, en el suelo 2 ninguno de los hongos



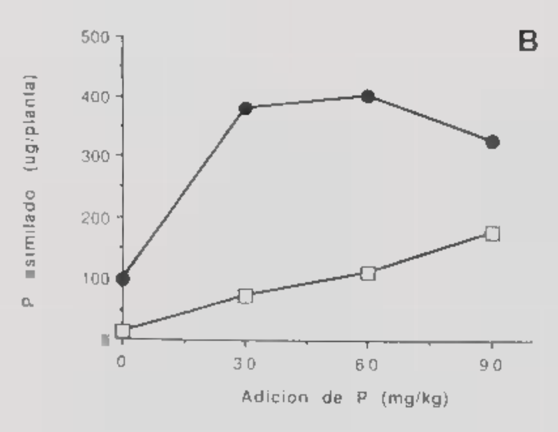


Figura 1: Efecto de la inoculación y la fertilización fosforada en la concentración foliar de P (A) y fósforo total asimilado (B) en plantas de *L. spartum*.

Figure 1: Effect of inoculation and P-fertilization on shoot P concentration (A) and total P assimilated (B) in *L. spartum* plants.

Hongo inoculado	Altura (cm)	Peso fresco (mg/planta)		Peso seco (mg/planta)		Micorrización (%)
		Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	
Control	18,6 a	174 a	357 a	82 a	73 a	0 a
G. fasciculatum	29.5 b	397 b	611 b	155 b	118 b	34 c
G. mosseae	29.1 b	411 b	610 b	140 b	110 b	22 b
Glomus sp. GPR31	31.3 b	340 b	471 ab	137 b	115 b	19 b

Tabla 3: Efecto de la inoculación con diferentes hongos A sobre el crecimiento y la micorrización de plantas de *L. spartum* en el suelo 1. Valores medios de cinco repeticiones. Los datos dentro de una misma columna con una letra en común no difieren significativamente (P<0,05) según el test de Duncan.

Table 3: Effect of inoculation with several A fungi on growth and mycorrhizal colonization of *L. spartum* in soil 1. Values are mean of five replicates. Data in a column followed by the same letter are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's test.

Hongo inoculado	Altura (cm)	Peso fresco (mg/planta)		Peso seco (mg/planta)		Micorrización (%)
		Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	
Control	18,7 a	510 a	1194 a	195 a	221 a	0 a
G. fasciculatum	23.2 c	776 bc	4472 c	289 abc	327 b	36 c
G. mosseae	19.4 ab	663 abc	2236 abc	235 ab	269 ab	25 bc
G. mosseae GPR30	22.7 bc	765 bc	2057 bc	278 ab	302 ab	35 c
G. etunicatum	18.8 a	830 c	2045 bc	292 abc	304 ab	32 bc
Glomus sp. GPR31	20.3 abc	562 ab	1513 ab	219 a	251 ab	16 a

Tabla 4: Efecto de la inoculación con diferentes hongos A sobre el crecimiento y la micorrización de plantas de *L. spartum* en el suelo 2. Valores medios de cinco repeticiones. Los datos dentro de una misma columna con una letra en común no difieren significativamente (P<0,05) según el test de Duncan.

Tabla 4: Effect of inoculation with several A fungi on growth and mycorrhizal colonization of *L. spartum* in soil 2. Values are mean of five replicates. Data in a column followed by the same letter are not significantly different (P<0.05) according to Duncans's test.

dió lugar a diferencias con significación estadística en el peso seco de la parte aérea, con respecto a los controles no micorrizados (Tabla 4). Se pone así de manifiesto la influencia que ejerce el sustrato en la efectividad de la simbiosis micorrícica (Díaz et

al., 1992). Se sabe que ciertas características del suelo (pH, textura, fertilidad, microflora, etc.) pueden influir en el comportamiento de diferentes endófitos. Además *L. spartum* es una planta que crece de forma natural en el suelo 2, con escasa población de hongos A (datos no publicados) y donde constituye una de las especies dominantes. De hecho, el crecimiento de *L. spartum* fue mayor en el suelo 2 que en el suelo 1, independientemente de su condición micorrícica. Se puede pensar que es una planta adaptada a estas condiciones y que no necesita del beneficio de la micorrización para producir un desarrollo óptimo. Sin embargo, en el suelo 1, con otras condiciones edáficas diferentes, sí obtiene un beneficio significativo de la simbiosis.

Los niveles de colonización radical son en general bajos, no superándose el 35%. En ambos suelos, *G. fasciculatum* fue el hongo más infectivo, y *Glomus sp.* GPR31, el menos.

Con respecto a la nutrición fosforada se observa que la concentración de P en los tejidos de las plantas micorrizadas es siempre superior a las de las no micorrizadas (Figura 2). Mientras que en el suelo 1 la mejora de la nutrición fosforada se refleja en el incremento de biomasa, en el suelo 2 esto no ocurre. Esto podría deberse a que en este suelo, sometido a importantes condiciones de estrés por contaminación por metales pesados (Tabla 1) el crecimiento de la planta micorrizada se vea limitado por otros factores, tales como la acumulación en exceso de otros elementos minerales. Es en el suelo 1 donde se observan mayores diferencias entre los endófitos, mientras que en el suelo 2 en todos los tratamientos de inoculación se obtienen valores similares de concentracion de P.

En la simbiosis micorrícica, más que de especificidad en sentido estricto, podría hablarse de compatibilidad entre planta, hongo y suelo. Segun el hongo considerado puede variar la repuesta a la inoculación (Simpson & Daft, 1990; Barea, 1991), aunque no se observa este comportamiento en nuestro estudio. Mas bien, las diferencias de crecimiento entre tratamientos parecen estar influenciadas por el tipo de suelo y la receptividad del mismo a la simbiosis.

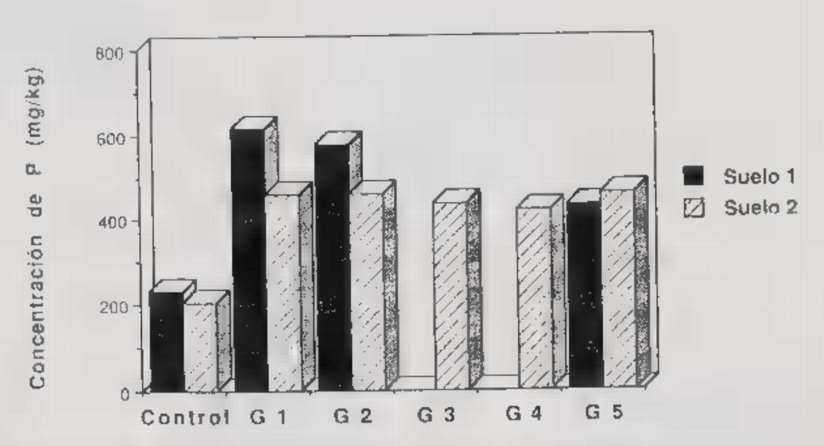


Figura 2: Concentración foliar de P en plantas de *L. spartum* inoculadas con distintos hongos A. G1: *G. fasciculatum*; G2: *G. mosseae*; G3: *G. mosseae* GPR30; G4: *G. etunicatum*; G5: *Glomus* sp. GPR31.

Figure 2: P concentration in shoots of *L. spartum* plants inoculated with several A fungi. G1: *G. fasciculatum*; G2: *G. mosseae*; G3: *G. mosseae* GPR30; G4: *G. etunicatum*; G5: *Glomus* sp. GPR31.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la inoculación con hongos endomicorrícicos resulta eficaz para estimular el crecimiento y la asimilacion de P en *L. spartum.* La micorrización proporciona un beneficio para la planta superior al de la fertilización fosforada a los niveles ensayados. Siendo el P uno de los factores que limitan la productividad en suelos deficitarios en este nutriente, se pone de manifiesto la importancia de una apropiada selección de los hongos formadores de micorrizas con vistas a [redacted] utilización con fines prácticos.

Dada la variabilidad de *L. spartum* en cuanto a la necesidad de las MA para obtener un crecimiento óptimo según la combinación suelo-hongo, se sugiere también la necesidad de realizar ensayos de micorrización para seleccionar hongos eficientes en cada caso concreto. En los suelos ensayados, donde *L. spartum* no presenta problemas de supervivencia, la selección de hongos que estimulen crecimiento y protuctividad es de gran importancia en la recuperación de zonas degradadas.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la beca concedida a Gisela Díaz Espejo.

REFERENCES

BAREA J.M., 1990 - Micorrizas vesiculo-arbusculares. *In:* J. CASADESUS & F. RUIZ-BERRAGUERO, *Microbiologia 1990.* Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, I: 271-278.

BAREA J.M., 1991 - Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *In:* B.A. STEWART, *Advances in Soil Sciences.* New York, Springer-Verlag, I: 1-40.

BAREA J.M., SALAMANCA C.P., HERRERA M.A. y ROLDAN-FAJARDO B.E., 1990 - La simbiosis microbio-planta en el establecimiento de una cubierta vegetal sobre suelos degradados. *In:* J. ALBALADEJO, M.A. STOCKING & E. DIAZ, *Soil degradation and rehabilitation in Mediterranean environmental conditions.* Murcia, CSIC, I: 139-158.

DIAZ G., ROLDAN A. y ALBALADEJO J., 1992 - Influencia del tipo de suelo sobre las pautas de colonización y eficiencia en la simbiosis micorricica de seis especies de *Glomus. Cryptogamie, Mycol.* 13: 47-56.

DUNCAN D., 1955 - Multiple range and multiple F-test. *Biometrics* 11: 1-42.

F.A.O., 1978 - *La erosión del suelo por el agua. Algunas medidas para combatirla en las tierras de cultivo.* Collección FAO: Fomento de tierras y aguas, Roma: 207 p.

FERNANDEZ J.A., NIELL F.X. and LUCENA J., 1985 - A rapid and sensitive automated determination of phosphate in natural waters. *Limnol. & Oceanogr.* 30: 227-230.

GERDEMANN J.W., 1975 - Vesicular-arbuscular mycorrhizae. *In:* J.G. TORREY & D.T. CLARKSON, *The development and function of roots.* London, Academic Press, I: 575-591.

GIOVANNETTI M. and MOSSE B., 1980 - An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-499.

GIANINAZZI-PEARSON V. y ASCON-AGUILAR C., 1991 - Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares. *In:* J. OLIVARES & J.M. BAREA, *Fijación y Movilizacíon Biologica de Nutrientes.* Madrid, CSIC, Servicio de publicaciones, I: 175-202.

HAYMAN D.S., 1983 - The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canad. J. Bot.* 61: 944-963.

HARLEY J.L. and HARLEY E.L., 1987 - A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytol.* 105: 1-102.

HETRICK B.A.D., WILSON G.T. and TODD T.C., 1990 - Differential responses of C_3 and C_4 grasses to mycorrhizal symbiosis, phosphorus fertilization, and soil microorganisms. *Canad. J. Bot.* 68: 461-467.

HEWITT E.J., 1952 - Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication n°22. 2n ed. revised. Commonw. Agric. Bureaux. London.

MEDINA O.A., SYLVIA D.M. and KRETSCHMER A.E. Jr., 1988 - Response of Sirato to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. II. Efficacy of selected vesicular-arbuscular fungi at different phosphorus levels. *Soil. Sci. Soc. Amer. J.* 52: 420-423.

MEDINA O.A., KRETSCHMER A.E.Jr. and SYLVIA D.M., 1990 - Growth response of field-grown Sirato (*Macroptilium atropurpureum* Urb.) and *Aeschynomene americana* L. to inoculation with selected vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Biol. Fertil. Soil.* 9: 54-66.

PHILLIPS J.M. and HAYMAN D.S., 1970 - Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.

SIMPSON D. and DAFT M.J., 1990 - Interaction between water-stress and different mycorrhizal inocula on plant growth and mycorrhizal development in maize and sorghum. *Plant Soil* 121: 179-186.

SMITH S.E. and GIANINAZZI-PEARSON V., 1988 - Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Rev. Pl. Physiol. Pl. Molec. Biol.* 39: 221-244.

WATERER D.R. and COLTMAN R.R., 1988 - Phosphorus concentration and application interval influence growth and mycorrhizal infection of tomato and onion transplants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 704-708.